

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE *Bacillus subtilis* PARA CONTROLE DA QUEDA PREMATURA DOS FRUTOS CÍTRICOS

MARCOS R. LOPES¹; KATIA C. KUPPER²; ALINE C. da SILVA³; MARIANA N. KLEIN⁴

Nº 10127

RESUMO

A queda prematura dos frutos cítricos, dado aos grandes prejuízos que têm causado aos produtores, constitui-se numa doença de grande importância econômica. A medida predominante de controle é a aplicação de fungicidas, que eleva o custo de produção e afeta negativamente o meio ambiente. Esse trabalho teve por objetivo desenvolver uma formulação com base na sobrevivência e eficiência antagonística de *Bacillus subtilis* em diferentes veículos de formulações. Os tratamentos testados foram: 1) pó-de-talco (0,5g de carboximetilcelulose (CMC) + 50g de talco (autoclavado a 121°C/30 min.)) + 50 mL do caldo bacteriano; 2) alginato (1 g de alginato de sódio autoclavado + 50 mL do caldo bacteriano); 3) caulim (0,5g de CMC + 50 g de pó-de-caulim autoclavado + 50 mL do caldo bacteriano); 4) vermiculita (0,5g de CMC + 50g de vermiculita fina peneirada (poro de 425µm) e autoclavada + 50 mL do caldo bacteriano) e 5) alginato de potássio (0,5g de CMC + 50 g de alginato de potássio autoclavado + 50 mL do caldo bacteriano). Os produtos foram armazenados em sacos de polietileno selados e incubados a 20°C por 12 meses. A atividade antagonista da bactéria foi determinada pela técnica do cultivo pareado e pela inoculação do patógeno em flores destacadas de citros. Verificou-se que talco e caulim foram os que proporcionaram um maior período de sobrevivência da bactéria, porém, todas as formulações testadas foram eficientes em manter a atividade antagonística de *B. subtilis* contra *C. acutatum*, com porcentagens de controle que variaram de 67 a 91%.

1. Bolsista CNPq: Graduação em Engenharia Agrônoma, UFSCar/CCA, Araras-SP.

✉ lopes.mrl@hotmail.com

2. Orientadora: Pesquisadora, IAC – Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”, Cordeirópolis-SP.

3. Colaborador: Graduação em Ciências Biológicas, UNIARARAS/ IAC – Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”, Cordeirópolis-SP.

4. Colaborador: Pós-graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural, UFSCar/CCA, Araras- SP/ IAC – Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”, Cordeirópolis-SP.

ABSTRACT

The fruit drop of citrus, given the large losses that have caused the producers, constitutes a disease of great economic importance. The predominant measure of control is the application of fungicides, which raises the cost of production and negatively affects the environment. This work aimed to develop a formulation based on survival and efficiency of antagonistic *Bacillus subtilis* at different vehicle formulations. The treatments were: 1) powder-talc (0.5 g of carboxymethylcellulose (CMC) + 50g of talc (autoclaved at 121°C/30 min.)) + 50 mL of bacterial broth, 2) sodium alginate (1 g sodium alginate autoclaved + 50 mL of bacterial broth) 3) kaolin (0.5 g + 50 g of CMC powder-autoclaved kaolin + 50 ml of bacterial broth), 4) vermiculite (0.5 g CMC + 50g fine vermiculite sieved (pore size 425µm) and autoclaved + 50 mL of bacterial broth) and 5) potassium alginate (0.5 g CMC + 50 g autoclaved potassium alginate+ 50 mL of bacterial broth). The products were stored in sealed polyethylene bags and incubated at 20°C for 12 months. The antagonistic activity of bacteria was determined by paired cultivation technique and pathogen inoculation on detached citrus flowers. It was found that talc and kaolin were those that provided a longer period of survival of the bacteria, however, all the tested formulations were effective in keeping the antagonistic activity of *B. subtilis* against *C. acutatum*, with control percentages ranging 67-91%.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de citros, além de grande exportador de suco de laranja (Citrusfeat, 2001). Não obstante a enorme importância que a atividade citrícola tem para a economia nacional, os pomares são acometidos por uma série de pragas e doenças que são responsáveis por reduções consideráveis na produção e na qualidade das frutas, tornando-se, em muitos casos, fatores limitantes ao processo de produção. Dentre essas doenças, pode-se destacar a “Queda Prematura dos Frutos Cítricos” (QPFC) descrita pela primeira vez em Belize, em 1979, como sendo causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz (Fagan, 1979), que foi reclassificado por Brown et al., (1996), como *Colletotrichum acutatum* Simmonds. Entretanto, os custos financeiros e ambientais de aplicações com produtos químicos, aliado às crescentes restrições à presença de resíduos, estão a exigir o estudo de novas alternativas, como o controle biológico. Dentre os antagonistas mais estudados, encontra-se a bactéria *Bacillus subtilis*, a qual vem se destacando no controle de doenças do filoplano e em pós-colheita (Pusey et al., 1986; Ferreira et al., 1991; Bettiol et al., 1994; Sonoda & Guo, 1996; Kalita et al., 1996; Kupper et al., 2003). No Brasil, Kupper & Gimenes-Fernandes (2002) estudaram a potencialidade antagonística de 64 isolados de *B. subtilis* a *C. acutatum* “in vitro” e em flores destacadas de lima ácida

'Tahiti'. Segundo os autores, todos os isolados produziram metabólitos capazes de inibir o crescimento micelial do fitopatógeno e muitos deles deram 100% de controle da doença em flores destacadas de lima ácida 'Tahiti'. Dentre sete isolados de *B. subtilis* testados para o controle da QPFC, em condições naturais de ocorrência da doença, um deles, o ACB-69, diferiu da testemunha (sem controle) e equiparou-se, estatisticamente, ao fungicida benomyl, proporcionando menor porcentagem de flores com sintomas e maior número médio de frutos efetivos (Kupper et al., 2003).

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação da bactéria

O isolado ACB-69 de *B. subtilis* foi obtido de folhas de laranja Valência, do município de Itápolis (SP) e pertence à coleção de microrganismos do laboratório de Fitopatologia do Centro de Citricultura "Sylvio Moreira"/IAC, Cordeirópolis/SP. O isolado da bactéria foi cultivado em meio Batata-dextrose (BD) por 48 horas, sob agitação constante a 22°C. Posteriormente, a suspensão do caldo bacteriano, com 1×10^8 ufc/mL, foi testado quanto à sua sobrevivência e eficiência antagonística em diferentes veículos de formulações.

Sobrevivência de *B. subtilis* em diferentes veículos de formulações

A sobrevivência da bactéria foi testada em cinco veículos de formulações: 1) pó-de-talco (0,5g de carboximetilcelulose (CMC) + 50g de talco (autoclavado a 121°C/30 min.)) + 50 mL do caldo bacteriano; 2) alginato (1 g de alginato de sódio autoclavado + 50 mL do caldo bacteriano); 3) caulim (0,5g de CMC + 50 g de pó-de-caulim autoclavado + 50 mL do caldo bacteriano); 4) vermiculita (0,5g de CMC + 50g de vermiculita fina peneirada (poro de 425µm) e autoclavada + 50 mL do caldo bacteriano) e 5) alginato de potássio (1 g de alginato de potássio autoclavado + 50 mL do caldo bacteriano). Os tratamentos foram armazenados em sacos de polietileno selados e incubados em estufa para BOD a 20°C , com fotoperíodo de 12/12 horas, por 12 meses. A avaliação da sobrevivência da bactéria nos diferentes tratamentos foi realizada mensalmente. Um grama do material formulado foi diluído a 10^{-6} em solução salina a 0,1M (0,9g de NaCl/L de água destilada) e as diluições foram plaqueadas em meio de cultura BDA, contidos em placas de Petri. A incubação das culturas se deu nas mesmas condições por 72 horas. Após esse período, a concentração da bactéria, nos respectivos tratamentos, foi determinada com o auxílio do hemocítômetro. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições, sendo cada placa de Petri, considerada uma parcela experimental.

Atividade antagonística de *B. subtilis*, após armazenamento em diferentes veículos de formulações, sob condições de laboratório

Para se verificar a influência das diferentes formulações, durante a armazenagem, na atividade antagonística de *B. subtilis* a *C. acutatum*, amostras de cada tratamento foram tomadas após 10 meses e plaqueadas em meio BDA. As colônias da bactéria, com um dia de idade, foram selecionadas e testadas contra o fitopatógeno por meio da técnica de cultivo pareado em placa de Petri, contendo BDA (Dennis & Webster, 1971).

Atividade antagonística de *B. subtilis*, após armazenamento em diferentes veículos de formulações, em flores destacadas de citros

Este ensaio teve por objetivo testar as diferentes formulações, após armazenagem, quanto à atividade antagonística de *B. subtilis* a *C. acutatum*, em flores destacadas de citros. Flores destacadas foram colocadas em caixas Gerbox, com os pedúnculos inseridos em orifícios efetuados em espuma sintética de 05 cm de espessura, a qual foi colocada sobre papel de filtro umedecido com água destilada e esterilizada. Para a inoculação foi aplicado uma gota de 10 µL de *C. acutatum* (1×10^4 esporos/mL) sobre cada pétala, 24 horas antes da aplicação dos produtos formulados, sendo o tratamento preventivo, e 24 horas depois, constituindo o tratamento curativo. As testemunhas foram constituídas de flores em que foi depositado apenas o *C. acutatum* ou água destilada e esterilizada em cada pétala. As caixas Gerbox, contendo as flores tratadas e inoculadas, foram mantidas em estufa para BOD. (fotoperíodo de 12 horas) à 20°C. A avaliação foi realizada 72 horas após a inoculação, determinando-se a porcentagem de pétalas com sintomas. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento repetido três vezes, de modo que, cada repetição foi representada por 10 flores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sobrevivência de *B. subtilis* em diferentes veículos de formulações

Os dados apresentados na Tabela 1 mostram que os melhores veículos de formulação para *B. subtilis* foram o talco e o caulim, os quais permitiram a sobrevivência da bactéria até o 10º mês de armazenagem. Por outro lado, os alginatos e a vermiculita permitiram a sobrevivência da bactéria até o quinto e o sexto mês, respectivamente.

TABELA 1. Efeito de diferentes veículos de formulações na sobrevivência e na produção número de médio de unidades formadores de colônias ($\times 10^{10}$) de *Bacillus subtilis*.

Meses	Veículos de formulação
-------	------------------------

	Caulim	Alg. Pot.	Alg. Sod.	Verm.	Talco
1º	9,0a ⁽¹⁾	7,9 ^a	6,8 ^a	6,1a	11,4 ^a
2º	6,1b	5,8b	7,3b	5,5b	10,1 ^a
3º	2,0a	1,7 ^a	2,1 ^a	1,6a	2,10 ^a
4º	2190,0b	3,1 b	21,8b	2,1b	2800,0a
5º	2,44c	216,6 ^a	195,2b	2,1c	2,44c
6º	4,89a	1,0d	0,8d	3,5b	2,61c
7º	3,04a	0,9d	0,50e	1,4c	2,3b
8º	3,44a	0	0,2c	3,4a	2,8 b
9º	4,18b	0	0	5,1a	1,6c
10º	2,64a	0	0	0,1c	1,5b

⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

Atividade antagonística de *B. subtilis*, após armazenamento em diferentes veículos de formulações, sob condições de laboratório

Pelos resultados apresentados na Figura 1, verifica-se que apenas os veículos de formulação a base de vermiculita e de alginato foram capazes de manter a característica antagonística de *B. subtilis*, quando em cultivo pareado em placas de Petri. Os dados mostraram ainda, que *B. subtilis* quando na formulação de alginato de sódio proporcionou uma inibição acima de 50% na colônia de *C. acutatum*, após 10 meses de armazenamento nesta formulação.

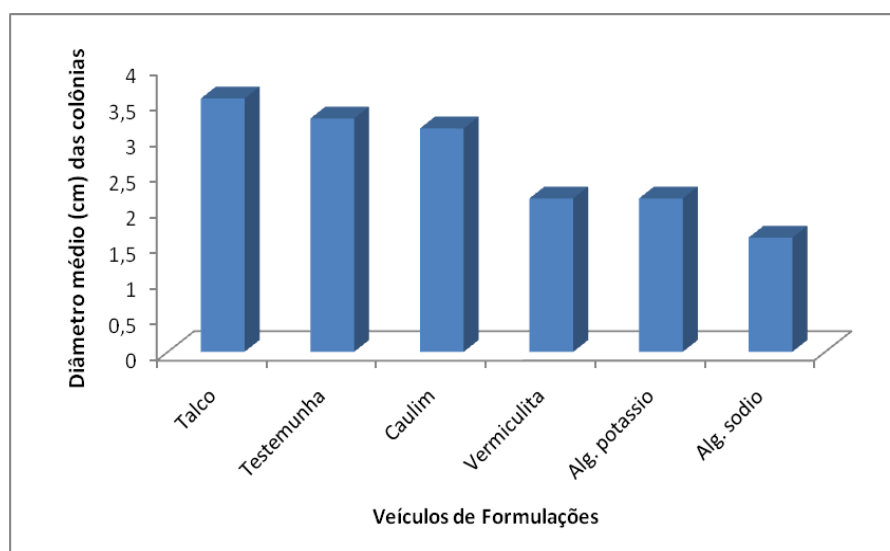


Figura 1. Avaliação do diâmetro médio das colônias de *Colletotrichum acutatum* e *Bacillus subtilis* (ACB-69) em cultivo pareado, nos diferentes meios de formulações.

Atividade antagonística de *B. subtilis*, após armazenamento em diferentes veículos de formulações, em flores destacadas de citros

Quando se avaliou a capacidade de *B. subtilis* em prevenir a infecção de *C. acutatum* em flores destacadas de lima ácida 'Tahiti', após armazenamento em diferentes veículos de formulação, verificou-se que todos os produtos testados foram eficientes, com porcentagens de controle que variaram de 67 a 91% tanto para o controle preventivo como para o curativo.

TABELA 2. Porcentagem de pétalas sem sintomas da queda prematura dos frutos cítricos, em flores destacadas de lima ácida 'Tahiti' tratadas com diferentes veículos de formulações de *Bacillus subtilis*, 24 horas depois da inoculação com *Colletotrichum acutatum*.

Tratamentos	Porcentagem de pétalas sadias	
Testemunha sem inoculação	100,00	a ⁽¹⁾
Talco	90,97	b
Caulim	90,07	b
Alginato de sódio	81,59	c
Vermiculita	76,11	c
Alginato de potássio	75,17	c
Testemunha inoculada	6,64	d

⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 3. Porcentagem de pétalas sem sintomas da queda prematura dos fruto cítricos, em flores destacadas de lima ácida 'Tahiti' tratadas com diferentes veículos de formulações de *Bacillus subtilis*, 24 horas antes da inoculação com *Colletotrichum acutatum*

Tratamentos	Porcentagem de pétalas sadias	
Testemunha sem inoculação	100,00	a ⁽¹⁾
Caulim	90,87	b
Talco	84,39	b
Alginato de sódio	83,04	b
Vermiculita	74,98	c
Alginato de potássio	66,61	c
Testemunha inoculada	6,54	d

⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Um dos maiores problemas no desenvolvimento de agentes de controle biológico é a falta de correlação entre o desempenho dos isolados no laboratório e no campo. Produção e formulação são marcas-chaves para transferir as propriedades do agente de biocontrole sob condições comerciais e de campo. O que se viu neste trabalho é que, embora alguns produtos tenham mostrado a diminuição da produção de células do agente de biocontrole, no decorrer do tempo de armazenamento, de um modo geral eles mantiveram a capacidade antagonística da bactéria, permitindo eficiência de controle até mesmo depois de 10 meses de armazenamento, fato esse observado nos testes *in vivo* com flores destacadas. Produção, no entanto, dá idéia de quantidade e não qualidade, e o que ficou claro nesse trabalho, é que mesmo diminuindo a quantidade de células a qualidade do produto se manteve, considerando que o objetivo de controle foi alcançado. No entanto, maiores estudos se fazem necessários, para que se possa manter a produção de células juntamente com uma boa qualidade de formulação.

CONCLUSÃO

- A maioria dos veículos de formulação testados foi eficiente para a sobrevivência de *Bacillus subtilis*;
- Todos os veículos de formulações testados mantiveram a atividade antagonística de *B. subtilis*.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pelo apoio financeiro na realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BETTIOL, W.; SAITO, M.L.; BRANDÃO, M.S.B. Controle da ferrugem do cafeeiro com produtos à base de *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**, v.20, p.119-122, 1994.
- BROWN, A.E.; SREENIVASAPRASAD, S.; TIMMER, L.W. Molecular characterization of slow-growing orange and Key Lime anthracnose of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. **Phytopathology**, v.86, p.523-527, 1996.
- CITRUSFEAT. Fresh citrus situation. FASonline. Horticultural & Tropical Products Division. 2001.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, v.57, p.359-363, 1971.

FERREIRA, J.H.S., MATTHEE, F.N., THOMAS, A.C. Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. **Phytopathology**, v.81, p.283-287, 1991.

KALITA, P.; BORA, L.C.; BHAGABATI, K.N. Phylloplane microflora of citrus and their role in management of citrus canker. **Indian Phytopathology**, v 49, p. 234-237, 1996.

KUPPER, K.C.; GIMENES-FERNANDES, N. Isolamento e seleção de *Bacillus* spp. para o controle de *Colletotrichum acutatum* em flores destacadas de lima ácida 'Tahiti'. **Summa Phytopathologica**, v. 28, p. 292-295, 2002.

PUSEY, P.L.; WILSON, C.L.; HOTCHKISS, M.W.; FRANKLIN, J.D. Compatibility of *Bacillus subtilis* for postharvest control of peach brown rot with commercial fruit waxes, dicloran, and cold-storage conditions. **Plant Disease**, v.70, p.587-590, 1986.

SONODA, R.M.; GUO, Z. Effect of spray applications of *Bacillus subtilis* on postbloom drop of citrus. **Phytopathology**, v.86, p.S52, 1996.